

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 10-66595

Date of Laid-Open: March 10, 1998

Application No. 8-224826

Filing date: August 27, 1996

Applicant: UNITIKA Ltd.

Inventors: Takashi Kimura and Heigoro Shirai

Title of the Invention:

A method for producing a glycoside of an alcoholic compound

Claim:

1. A method for producing a glycoside of an alcoholic compound comprising adding an alcoholic compound immiscible with water to an aqueous solution containing lactose and  $\beta$ -galactosidase or a microorganism containing  $\beta$ -galactosidase in an amount to exceed the saturated concentration against water, and carrying out the reaction to produce the glycoside in two layer system.

Page 3, right column, line 28 to page 4, left column, line 2

[0015] Then, 40 g of lactose and 6000 units of crude  $\beta$ -galactosidase enzyme solution were dissolved in 10mM phosphate buffer (pH 8.0) to make 100ml of solution. To this solution, 100ml (about one-fold volume of aqueous layer) of phenethyl alcohol (manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., the highest purity reagent) was overlaid to form two layer system consisting of the aqueous layer and the phenethyl alcohol layer. The reaction

was allowed in the two layer system at 40°C for 20 hours with stirring vigorously. After the reaction was stopped, the phenethyl alcohol layer was separated by using a separatory funnel. The phenethyl alcohol layer obtained was distilled under reduced pressure to obtain a residue. The residue was dissolved in 30ml of water and extracted with an equal volume of chloroform three times to remove the residual phenethyl alcohol. Then, the thus obtained aqueous layer was spray-dried to obtain 7.1 g of powdered glycoside of phenethyl alcohol. <sup>13</sup>C-NMR of the obtained glycoside of phenethyl alcohol was measured in deuterium oxide by using VXR300 manufactured by Varian. Signals at 38.1, 63.8, 71.5, 73.5, 73.6, 75.6, 77.9, 105.7, 129.4, 131.5, 131.9, and 141.6 (ppm) were observed. By hydrolyzing the obtained glycoside of phenethyl alcohol with  $\beta$ -galactosidase derived from *Aspergillus oryzae* (manufactured by Shinnihonkagaku), phenethyl alcohol and D-galactose were produced. The above result was demonstrated that the obtained glycoside of phenethyl alcohol was phenethyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

Page 4, left column, lines 25 to 28

The above result was demonstrated that the obtained glycoside of cis-3-hexenol was cis-hexenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

Page 4, right column, lines 17 to 19

The above result was demonstrated that the obtained menthol was menthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

Page 4, right column, lines 20 to 26

[0018] Example 4

Using geraniol, citronellol, nellol, 1-hexanol, 1-octanol, santalol, benzyl alcohol, cinnamyl alcohol, or anise alcohol in place of phenethyl alcohol in Example 1,  $\beta$ -D-galactoside which corresponds to each alcohol was synthesized in the same manner as described in Example 1.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-66595

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月10日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/44			C 1 2 P 19/44	
// (C 1 2 P 19/44				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平8-224826

(22) 出願日 平成8年(1996) 8月27日

(71) 出願人 000004503

ユニチカ株式会社

兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

(72) 発明者 木村 隆

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 白井 丙午郎

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 アルコール性化合物の配糖体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 アルコール性化合物の配糖体を簡便な操作で、安価に、かつ容易に製造することができるアルコール性化合物の配糖体の製造方法を提供する。

【解決手段】 ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する菌体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を添加してアルコール性化合物の配糖体を製造するに際し、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で配糖化反応を行うことを特徴とするアルコール性化合物の配糖体の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する固体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を添加してアルコール性化合物の配糖体を製造するに際し、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で配糖化反応を行うことを特徴とするアルコール性化合物の配糖体の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、生産効率に優れたアルコール性化合物の配糖体の製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 配糖体は動植物界に広く存在し、これらの中には種々の生理活性を有するものも知られている。油性のアルコール性化合物は、糖とグリコシル化して配糖体の形態になると、不揮発性となり安定化し、さらに疎水性化合物が親水化される等、物理・化学的な性質が大きく変化する。このため、油性のアルコール性化合物の配糖体を種々に応用することが提案されている。このようなアルコール性化合物の配糖体は、従来、化学的手法及び酵素的手法により合成されてきた。化学的手法としては、例えば、糖のアセタート誘導体とアルコール類を酸触媒の存在下でグリコシル化させる反応を用いた方法やKoenigs-Knorr 反応を用いた方法が報告されている（油化学、43、31(1994)）。また、酵素的手法としては、シクロヤシトデキストリン・グルコトランスフェラーゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて各種アルコール性化合物の配糖体を合成できることが報告されている（バイオテクノロジー・ターズ、13、863(1991)）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらのうち、化学的手法は工程数が多く、高価な糖供与体を使用するためにコスト高になる等の問題があり、また、酵素的手法では、特に高温な酵素は必要としないものの、生成物である配糖体は水溶液中に溶解しているため、分離操作等の複雑な操作により精製しなければならず、このため、配糖体を工業的に製造するのは難しいという問題があった。本発明は、アルコール性化合物の配糖体を、安価に、かつ容易に製造することができ、さらに、分離操作等の複雑な精製操作を必要としないアルコール性化合物の配糖体の製造方法を提供することを目的とするものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、前記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又はこの酵素を含有する固体とを含む水溶液に水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で

配糖化反応を行うと、生成した配糖体はアルコール層へ優先的に分配するため、後の精製操作が容易になるということを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する固体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を添加してアルコール性化合物の配糖体を製造するに際し、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で配糖化反応を行うことを特徴とするアルコール性化合物の配糖体の製造方法を要旨とするものである。

## 【0005】

【発明の実施の形態】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明でいう水と混和しないアルコール性化合物とは、水への溶解性が20重量%以下の疎水性アルコール性化合物をいい、このような化合物としては、例えば、ステロイド、シトロネロール、オロール、シアール・ヘキセノール、1-ヘキサノール、1-オクタノール等の脂肪族アルコール類、メントール、サリタロール等の脂環族アルコール類、アミファアルコール、ベンジルアルコール、フェニチルアルコール、シナミルアルコール等の芳香族アルコール類等が挙げられる。これらのアルコール性化合物のうち、常温で固体のものは、加熱するなどして溶解して使用すればよい。また、これらのアルコール性化合物は減圧蒸留によって容易に回収・再利用される。

【0006】 本発明に用いられる $\beta$ -ガラクトシダーゼとしては、エシエリチア・コリ（*Escherichia coli*）、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）、アスペルギルス・ニグー（*Aspergillus niger*）等の微生物由来の酵素、牛肝臓等の動物臓器由来の酵素、ジャック・ビー、ア（Jack beans）等の植物由来の酵素が挙げられる。これらの酵素は、そのままの形で使用してもよいし、各種の固定化法により固定化したものも使用することができ、さらには、脂質等で修飾した修飾酵素として使用することも可能である。

【0007】 また、本発明に用いられる固体としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する固体であればいかなるものでもよく、野生型菌体は勿論のこと、自然的変異に人為的変異型菌体や $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み入れた組換え菌体等が挙げられる。このような固体としては、例えば、エシエリチア・コリ JM109(p $\beta$ Gal12 (FERM F-15642)）、エシエリチア・コリ C600等が挙げられる。

【0008】 これらの菌体は一般に栄養基を含む培地で培養することにより、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の高い菌体を得ることができ、また、培養液としてグリコース、ショ糖、糖蜜等を用い、菌体を充分増殖させた後にグリコースを添加し、さらに培養を続け、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを充分誘導させた後に、菌体を遠心分離

10

20

30

40

50

過算に通常用いられる方法により回収すれば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の高い菌体をより大量に得ることができ、培養に用いる培養源としては、例えば、トリプトン、カゼイン、コーンマライツカー、肉エキスを酵母等が有機窒素源で、硫酸、塩化マグネシウム、尿素等が無機窒素源を用いることができる。さらに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産性を上げるために、イソプロピルー $\beta$ -D-チオサカラクトピラノシド等の誘導物質を添加してもよい。本発明においては、このようにして得られた菌体を遠心、濾過等の方法により回収し、洗浄したものをそのまま反応に用いることもでき、さらには、これらの菌体を各種の固定化法により固定化したものも使用することができる。

【0009】本発明においては、ラクトースと、ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する菌体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加することによってアルコール層と水層の2層系を形成し、配糖化反応を進行させる。

【0010】このときのアルコール性化合物の添加量としては、水に対する飽和濃度以上であれば特に限定されるものではないが、生産性の観点から考えて、水層に対して1/3～3倍量を加えることが好ましく、特に1/2～2倍量を加えることが好ましい。また、ラクトースの濃度としては、水層の1～50重量%が適当であり、10～40重量%が好ましい。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する菌体の濃度としては、酵素活性換算で1～100ユニット/ミリリットルが好ましく、特に20～100ユニット/ミリリットルが好ましい。

【0011】反応時のpH及び反応温度としては、使用する酵素種ごとに適宜選べばよいが、それぞれの酵素の至適pH及び至適温度を選べばよい。また、反応時間としては、使用する酵素量あるいは菌体量により適宜選べばよいが、目的とするアルコール性化合物の配糖体の蓄積量が最大になるような時間を選べばよい。通常、配糖体はアルコール層中に、5～10重量%蓄積する。

【0012】このような方法によって製造したアルコール性化合物の配糖体はアルコール層中に優先的に分配するので、アルコール層と水層を分離し、得られたアルコール層からアルコール性化合物を減圧蒸留によって除いた後の残渣として配糖体を得ることができる。残渣として得られた配糖体は一般にかなり量のアルコール性化合物を含んでいるが、これらから反応原料は酢酸エチル、メタノール、トルエン、ヘキサン、等比較的疎水性溶媒により、選択的に抽出・除去することが可能である。また、適当な溶媒から配糖体を再結晶することによって、未反応原料を除去することができる。

【0013】本発明の方法により製造したアルコール性化合物の配糖体は、水溶解性及び保存安定性に優れ、無

香性であるため、例えば、香料性の香料として、香水、オーデコロン、シャンプー、リンス、石鹸、整髪料、洗剤、化粧品、マニキュア、粘着剤、化粧料、清涼飲料、菓子、冷凍食品、製菓用、酒類、肉、飼料、煙草等の食品、畜所用、住居用、風船用等の芳香剤、紙おむつ、生地用ナプキン、等の吸収性物品、入浴剤、洗剤等に使用することができる。

#### 【0014】

【実施例】次に、本発明を実施例によって具体的に説明する。

##### 実施例1

LB培地（トリプトン（ダイオコ社製）1重量%、イーストエキストラクト（ダイオコ社製）0.5重量%、NaCl 1重量%、pH7.2）100ミリリットルの入った三角フラスコ2本にエシェリキア・コリ JM109 p $\beta$ -Gal2（FERM P-15642）を各1白金耳接種し、37℃で一晩培養した。この前培養液をLB培地20リットルに接種し、37℃で5時間培養した後、イソプロピルー $\beta$ -D-チオサカラクトピラノシド（和光純薬工業社製、特級試薬）を1mMとなるように加えて、さらに37℃で8時間培養した。得られた培養液を遠心分離して湿固体100gを得た。湿固体100gを1mMの塩化マグネシウムを含む50mMのリン酸緩衝液（pH7.0）500ミリリットルに懸濁し、超音波破砕した。破砕液を遠心分離（4,000g、30分）し、その上清液を $\beta$ -ガラクトシダーゼ粗酵素液とした（比活性95ユニット/gm）。

【0015】次に、ラクトース40g及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ粗酵素液6000ユニットを10mMのリン酸緩衝液（pH8.0）に溶解して100ミリリットルとし、これにフェニルアルコール（和光純薬工業社製、特級試薬）100ミリリットル（水層に対して約1倍量）を重層して水層とフェニルアルコール層の2層系を形成し、40℃で激しく攪拌しながら20時間反応させた。反応終了後、フェニルアルコール層を分液漏斗を用いて分離し、得られたフェニルアルコール層を減圧蒸留することによって得られた残渣を50ミリリットルの水に溶解し、等容のクロロホルムで3回抽出することにより、残存するフェニルアルコールを除去した。続いて、得られた水層をスプレッドライすることによりフェニルアルコールの配糖体粉末7.1gを得た。得られたフェニルアルコールの配糖体の<sup>13</sup>C-NMRを重水中で、パイプ社製のVXR300を用いて測定した。その結果、38.1、63.8、71.5、73.5、73.6、75.6、77.9、106.7、129.4、131.5、131.9、141.6ppmにシグナルが観測された。また、得られたフェニルアルコールの配糖体をアブソンキア・マリーニ由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ（新日本化学社製）で加水分解すると、フェニルアルコールとD-ガラクトースが生成した。以上の結果から、上記で得られたフェニルアルコール

の配糖体の構造はメネチル-β-D-ガラクトピラノシドであることが判明した。

#### 【0016】実施例2

ラクトース40g及びβ-ガラクトシダーゼ精製標品（シグマ社製）2000ユニットを10mMのリン酸緩衝液（pH8.0）に溶解して100ミリリットルとし、これにシス-3-ハキシコール（和光純薬工業社製、特許試薬）100ミリリットル（水層に対して約1倍容）を重ねて水層とシス-3-ハキシコール層の2層系を形成し、40℃で激しく攪拌しながら20時間反応させた。反応終了後、シス-3-ハキシコール層を分液ロータを用いて分離し、得られたシス-3-ハキシコール層を減圧蒸留することによって得られた残渣を20ミリリットルの水に溶解し、等容のクロロホルムで3回抽出することにより、残存するシス-3-ハキシコールを除去した。次いで、得られた水層をスプレードライすることによりシス-3-ハキシコールの配糖体粉末3.6gを得た。得られたシス-3-ハキシコール配糖体の<sup>13</sup>C-NMRを重水中で、リリア社製のVXR300を用いて測定した。その結果、14.0、20.9、30.2、62.0、62.8、69.8、73.0、73.9、76.1、97.5、124.4、134.9ppmにシグナルが観測された。また、得られたシス-3-ハキシコールの配糖体をアスピルギルス・オリゼ由来のβ-ガラクトシダーゼで加水分解すると、シス-3-ハキシコールとD-ガラクトースが生成した。以上の結果から、上記で得られたシス-3-ハキシコールの配糖体の構造はシス-3-ハキシコール-β-D-ガラクトピラノシドであることが判明した。

#### 【0017】実施例3

ラクトース40g及びエシェリチア・コリ JM109/pβ-Gal2 (FERM P-15642) 菌体1.3gを10mMのリン酸緩衝液（pH8.0）に懸濁して100ミリリットルと

し、これにメントール（和光純薬工業社製、特許試薬）100gを加熱溶解して重層して水層とメントール層の2層系を形成し、40℃で激しく攪拌しながら20時間反応させた。反応終了後、メントール層を分液ロータを用いて分離し、得られたメントール層を減圧蒸留することによって得られた残渣を100ミリリットルの水に溶解し、等容のクロロホルムで3回抽出することにより、残存するメントールを除去した。次いで、得られた水層をスプレードライすることによりメントールの配糖体粉末1.0gを得た。得られたメントールの配糖体の<sup>13</sup>C-NMRを重水中で、リリア社製のVXR300を用いて測定した。その結果、16.2、21.0、22.2、23.3、25.9、31.7、34.6、45.1、50.2、62.0、69.8、71.5、73.0、73.9、76.1、97.5ppmにシグナルが観測された。また、得られたメントールの配糖体をアスピルギルス・オリゼ由来のβ-ガラクトシダーゼで加水分解すると、メントールとD-ガラクトースが生成した。以上の結果から、上記で得られたメントール配糖体の構造はメネチル-β-D-ガラクトピラノシドであることが判明した。

#### 【0018】実施例4

実施例1のメネチルアルコールの代わりにゲラニオール、シトロネロール、ネロール、1-ハキシコール、1-オクタノール、センタノール、ペンジルアルコール、シシナミルアルコール、アニスアルコールを用いた以外は実施例1の方法と同様にして、対応するそれぞれのアルコールのβ-D-ガラクトピラノシドを合成した。

#### 【0019】

【発明の効果】本発明によれば、アルコール性化合物の配糖体をカラム処理等の複雑な精製操作を必要としない簡便な操作で、安価に、かつ容易に製造することができ

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10066595 A**

(43) Date of publication of application: **10 . 03 . 98**

(51) Int. Cl.

**C12P 19/44**  
**/(C12P 19/44 , C12R 1:19 )**

(21) Application number: **08224826**

(22) Date of filing: **27 . 08 . 96**

(71) Applicant: **UNITIKA LTD**

(72) Inventor: **KIMURA TAKASHI**  
**SHIRAI HEIGOROU**

(54) **PRODUCTION OF GLYCOSIDE OF ALCOHOLIC COMPOUND**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a glycoside of an alcoholic compound by which the glycoside of the alcoholic compound can readily be produced at a low cost according to simple operations.

SOLUTION: An alcoholic compound immiscible with water

is added to an aqueous solution containing lactose, a  $\beta$ -galactosidase or a microbial cell containing the  $\beta$ -galactosidase so as to provide the saturated concentration of the alcoholic compound or above based on the water to carry out the glycosidation reaction in a two-layer system when adding the alcoholic compound immiscible with water to the aqueous solution and producing the glycoside of the alcoholic compound.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-66595

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月10日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 19/44

C 1 2 P 19/44

// (C 1 2 P 19/44

C 1 2 R 1: 19)

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平8-224826

(22) 出願日 平成8年(1996) 8月27日

(71) 出願人 000004503

ユニチカ株式会社

兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

(72) 発明者 木村 隆

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(72) 発明者 白井 丙午郎

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 アルコール性化合物の配糖体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 アルコール性化合物の配糖体を簡便な操作で、安価に、かつ容易に製造することができるアルコール性化合物の配糖体の製造方法を提供する。

【解決手段】 ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する菌体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を添加してアルコール性化合物の配糖体を製造するに際し、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で配糖化反応を行うことを特徴とするアルコール性化合物の配糖体の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する菌体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を添加してアルコール性化合物の配糖体を製造するに際し、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で配糖化反応を行うことを特徴とするアルコール性化合物の配糖体の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、生産効率に優れたアルコール性化合物の配糖体の製造方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 配糖体は動植物界に広く存在し、これらの中には種々の生理活性を有するものも知られている。油性のアルコール性化合物は、糖とO-グリコシル化して配糖体の形態になると、不揮発性となり安定化し、さらに疎水性化合物が親水化される等、物理・化学的な性質が大きく変化する。このため、油性のアルコール性化合物の配糖体を種々に応用することが提案されている。このようなアルコール性化合物の配糖体は、従来、化学的手法及び酵素的手法により合成されてきた。化学的手法としては、例えば、糖のアセタート誘導体とアルコール類を酸触媒の存在下でグリコシル化させる反応を用いた方法やKoenigs-Knorr 反応を用いた方法が報告されている〔油化学, 43, 31(1994)〕。また、酵素的手法としては、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて各種アルコール性化合物の配糖体を合成できることが報告されている〔バイオテクノロジーレターズ, 13, 863(1991)〕。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらのうち、化学的手法は工程数が多く、高価な糖供与体を使用するためにコスト高になる等の問題があり、また、酵素的手法では、特に高価な試薬は必要としないものの、生成物である配糖体は水溶液中に溶解しているため、カラム操作等の複雑な操作により精製しなければならず、このため、配糖体を工業的に製造するのは難しいという問題があった。本発明は、アルコール性化合物の配糖体を、安価に、かつ容易に製造することができ、さらに、カラム操作等の複雑な精製操作を必要としないアルコール性化合物の配糖体の製造方法を提供することを目的とするものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、前記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又はこの酵素を含有する菌体とを含む水溶液に水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で

配糖化反応を行うと、生成した配糖体はアルコール層へ優先的に分配するため、後の精製操作が容易になるということを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、ラクトースと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する菌体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を添加してアルコール性化合物の配糖体を製造するに際し、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加して2層系で配糖化反応を行うことを特徴とするアルコール性化合物の配糖体の製造方法を要旨とするものである。

## 【0005】

【発明の実施の形態】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明でいう水と混和しないアルコール性化合物とは、水への溶解性が20重量%以下の疎水性アルコール性化合物をいい、このような化合物としては、例えば、グラニオール、シトロネロール、ネロール、シス-3-ヘキセノール、1-ヘキサノール、1-オクタノール等の脂肪族アルコール類、メントール、サンタロール等の脂環族アルコール類、アニスアルコール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、シナミルアルコール等の芳香族アルコール類等が挙げられる。これらのアルコール性化合物のうち、常温で固体のものは、加熱するなどして溶解して使用すればよい。また、これらのアルコール性化合物は減圧蒸留によって容易に回収・再利用される。

【0006】 本発明に用いられる $\beta$ -ガラクトシダーゼとしては、エシェリチア・コリ (Escherichia coli)、アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 等の微生物由来の酵素、牛肝臓等の動物臓器由来の酵素、ジャクビーンズ (Jack beans) 等の植物由来の酵素が挙げられる。これらの酵素は、そのままの形で使用してもよいし、各種の固定化法により固定化したものも使用することができる。さらには、脂質等で修飾した修飾酵素として使用することも可能である。

【0007】 また、本発明に用いられる菌体としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する菌体であればいかなるものでもよく、野生型菌体は勿論のこと、自然的並びに人為的変異型菌体や、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み入れた組換え菌体等が挙げられる。このような菌体としては、例えば、エシェリチア・コリ JM109/p  $\beta$ Gal12 (FERM P-15642)、エシェリチア・コリ C600等が挙げられる。

【0008】 これらの菌体は一般にラクトースを含む培地で培養することにより、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の高い菌体を得ることができる。また、炭素源としてグルコース、ショ糖、廃糖蜜等を用い、菌体を充分増殖させた後にラクトースを添加し、さらに培養を続け、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを充分誘導させた後に、菌体を遠心、濾

10

20

30

40

50

過等の通常用いられる方法により回収すれば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の高い菌体をより大量に得ることができる。培養に用いる窒素源としては、例えば、ペプトン、カゼイン、コーンステイプリカー、肉エキス、酵母エキス等の有機窒素源や、硫酸、塩化アンモニウム、尿素等の無機窒素源を用いることができる。さらに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの生産性を上げるために、イソプロピルー $\beta$ -D-チオーガラクトピラノシド等の誘導物質を添加してもよい。本発明においては、このようにして得られた菌体を、遠心、濾過等の方法により回収し、洗浄したものをそのまま反応に用いることもできるし、さらには、これらの菌体を各種の固定化法により固定化したものも使用することができる。

【0009】本発明においては、ラクトースと、ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する菌体とを含む水溶液に、水と混和しないアルコール性化合物を水に対する飽和濃度以上となるように添加することによってアルコール層と水層の2層系を形成し、配糖化反応を進行させる。

【0010】このときのアルコール性化合物の添加量としては、水に対する飽和濃度以上であれば特に限定されるものではないが、生産性の観点から考えて、水層に対して1/3~3倍容を加えることが好ましく、特に1/2~2倍容を加えることが好ましい。また、ラクトースの濃度としては、水層の1~50重量%が適当であり、10~40重量%が好ましい。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する菌体の濃度としては、酵素活性換算で1~100ユニット/ミリリットルが好ましく、特に20~100ユニット/ミリリットルが好ましい。

【0011】反応時のpH及び反応温度としては、使用する酵素種ごとに適宜選べばよいが、それぞれの酵素の至適pH及び至適温度を選べばよい。また、反応時間としては、使用する酵素量あるいは菌体量により適宜選べばよいが、目的とするアルコール性化合物の配糖体の蓄積量が最大になるような時間を選べばよい。通常、配糖体はアルコール層中に0.5~10重量%蓄積する。

【0012】このような方法によって製造したアルコール性化合物の配糖体はアルコール層中に優先的に分配するので、アルコール層と水層を分離し、得られたアルコール層からアルコール性化合物を減圧蒸留によって除いた後の残渣として配糖体を得ることができる。残渣として得られた配糖体は一般にかなりの量のアルコール性化合物を含んでいるが、これらの未反応原料は酢酸エチル、クロロホルム、トルエン、ヘキサン等の比較的疎水性の高い溶媒により選択的に抽出・除去することが可能である。また、適当な溶媒から配糖体を再結晶することによっても、未反応原料を除くことができる。

【0013】本発明の方法により製造したアルコール性化合物の配糖体は、水溶解性及び保存安定性に優れ、無

香性であるため、例えば、徐放性の香料として、香水、オーデコロン、シャンプー、リンス、石鹸、整髪料、洗口剤、制汗剤、マッサージ粉末等の化粧品、清涼飲料、菓子、冷菓、乳製品、酒類、肉、歯磨粉、煙草等の食品、台所用、住居用、風呂用等の芳香剤、紙おむつ、生理用ナプキン等の吸収性物品、入浴剤、洗剤等に使用することができる。

#### 【0014】

【実施例】次に、本発明を実施例によって具体的に説明する。

##### 実施例1

LB培地〔トリプトン（ディフコ社製）1重量%、イーストエキストラクト（ディフコ社製）0.5重量%、NaCl 1重量%：pH7.2〕100ミリリットルの入った三角フラスコ2本にエシェリチア・コリ JM109/p  $\beta$ Gal2 (FERM P-15642) を各1白金耳植菌し、37℃で一晩前培養した。この前培養液をLB培地20リットルに植菌し、37℃で5時間培養した後、イソプロピルー $\beta$ -D-チオーガラクトピラノシド（和光純薬工業社製、特級試薬）を1mMとなるように加えて、さらに37℃で8時間培養した。得られた培養液を遠心分離して湿菌体100gを得た。湿菌体100gを1mMの塩化マグネシウムを含む50mMのリン酸緩衝液（pH7.0）500ミリリットルに懸濁し、超音波破碎した。破碎液を遠心分離（4,000g、30分）し、その上清液を $\beta$ -ガラクトシダーゼ粗酵素液とした（比活性95ユニット/mg）。

【0015】次に、ラクトース40g及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ粗酵素液6000ユニットを10mMのリン酸緩衝液（pH8.0）に溶解して100ミリリットルとし、これにフェネチルアルコール（和光純薬工業社製、特級試薬）100ミリリットル（水層に対して約1倍容）を重ねて水層とフェネチルアルコール層の2層系を形成し、40℃で激しく攪拌しながら20時間反応させた。反応終了後、フェネチルアルコール層を分液ロートを用いて分離し、得られたフェネチルアルコール層を減圧蒸留することによって得られた残渣を30ミリリットルの水に溶解し、等容のクロロホルムで3回抽出することにより、残存するフェネチルアルコールを除去した。次いで、得られた水層をスプレードライすることによりフェネチルアルコールの配糖体粉末7.1gを得た。得られたフェネチルアルコールの配糖体の<sup>13</sup>C-NMRを重水中でバリアン社製のVXR300を用いて測定した。その結果、38.1、63.8、71.5、73.5、73.6、75.6、77.9、105.7、129.4、131.5、131.9、141.6ppmにシグナルが観察された。また、得られたフェネチルアルコールの配糖体をアスペルギルス・オリゼ由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ（新日本化学社製）で加水分解すると、フェネチルアルコールとD-ガラクトースが生成した。以上の結果から、上記で得られたフェネチルアルコール

10

20

30

40

50

の配糖体の構造はフェネチル-β-D-ガラクトピラノシドであることが判明した。

#### 【0016】実施例2

ラクトース40g及びβ-ガラクトシダーゼ精製標品(シグマ社製)2000ユニットを10mMのリン酸緩衝液(pH8.0)に溶解して100ミリリットルとし、これにシス-3-ヘキセノール(和光純薬工業社製、特級試薬)100ミリリットル(水層に対して約1倍容)を重層して水層とシス-3-ヘキセノール層の2層系を形成し、40℃で激しく攪拌しながら20時間反応させた。反応終了後、シス-3-ヘキセノール層を分液ロートを用いて分離し、得られたシス-3-ヘキセノール層を減圧蒸留することによって得られた残渣を20ミリリットルの水に溶解し、等容のクロロホルムで3回抽出することにより、残存するシス-3-ヘキセノールを除去した。次いで、得られた水層をスプレードライすることによりシス-3-ヘキセノールの配糖体粉末3.6gを得た。得られたシス-3-ヘキセノール配糖体の<sup>13</sup>C-NMRを重水中でバリアン社製のVXR300を用いて測定した。その結果、14.0、20.9、30.2、62.0、62.8、69.8、73.0、73.9、76.1、97.5、124.4、134.9ppmにシグナルが観察された。また、得られたシス-3-ヘキセノールの配糖体をアスペルギルス・オリゼ由来のβ-ガラクトシダーゼで加水分解すると、シス-3-ヘキセノールとD-ガラクトースが生成した。以上の結果から、上記で得られたシス-3-ヘキセノールの配糖体の構造はシス-3-ヘキセニル-β-D-ガラクトピラノシドであることが判明した。

#### 【0017】実施例3

ラクトース40g及びエシェリチア・コリ JM109/p β-Gal12 (FERM P-15642) 菌体1.3gを10mMのリン酸緩衝液(pH8.0)に懸濁して100ミリリットルと \*

\*し、これにメントール(和光純薬工業社製、特級試薬)

100gを加熱溶解して重層して水層とメントール層の2層系を形成し、47℃で激しく攪拌しながら20時間反応させた。反応終了後、メントール層を分液ロートを用いて分離し、得られたメントール層を減圧蒸留することによって得られた残渣を100ミリリットルの水に溶解し、等容のヘキサンで3回抽出することにより、残存するメントールを除去した。次いで、得られた水層をスプレードライすることによりメントールの配糖体粉末1.0gを得た。得られたメントールの配糖体の<sup>13</sup>C-NMRを重水中でバリアン社製のVXR300を用いて測定した。その結果、16.2、21.0、22.2、23.3、25.9、31.7、34.6、45.1、50.2、62.0、69.8、71.5、73.0、73.9、76.1、97.5ppmにシグナルが観察された。また、得られたメントールの配糖体をアスペルギルス・オリゼ由来のβ-ガラクトシダーゼで加水分解すると、メントールとD-ガラクトースが生成した。以上の結果から、上記で得られたメントール配糖体の構造はメンチル-β-D-ガラクトピラノシドであることが判明した。

#### 【0018】実施例4

実施例1のフェネチルアルコールの代わりにゲラニオール、シトロネロール、ネロール、1-ヘキサノール、1-オクタノール、サンタノール、ベンジルアルコール、シンナミルアルコール、アニスアルコールを用いた以外は実施例1の方法と同様にして、対応するそれぞれのアルコールのβ-D-ガラクトシドを合成した。

#### 【0019】

【発明の効果】本発明によれば、アルコール性化合物の配糖体をカラム処理等の複雑な精製操作を必要としない簡便な操作で、安価に、かつ容易に製造することができる。